Réplication de l'ADN

1) réplication chez les procaryotes :

- Synthèse de la nouvelle chaîne dans le sens 5'-3'

La synthèse de la nouvelle chaîne d'ADN est réalisée par une ADN polymérase, qui ajoute les nucléotides présents dans le milieu à l'extrémité 3'OH d'un nucléotide correctement apparié. La synthèse se fait donc dans le sens 5'-3' :

5' P brin matrice 3' OH

3' OH 5' P

nucléotide à ajouter

brin en train d'être synthétisé

Il est nécessaire que la synthèse se fasse dans le sens 5'-3' : en effet, l'activité correctrice de la polymérase ne peut marcher que dans ce sens. L'activité correctrice consiste à exciser un nucléotide mal apparié qui vient d'être ajouté en bout de chaîne et à reprendre l'élongation. Or, pour ajouter un nucléotide, il faut que le phosphate venant réaliser la fonction diester soit activé, et l'excision d'un nucléotide laisse un phosphate inactivé. Si la synthèse se faisait dans le sens 3'-5', le phosphate participant à la liaison diester serait celui de la chaîne en croissance, qui verrait donc son élongation s'arrêter. Tandis que si la synthèse se fait dans le sens 5'-3', le phosphate désactivé est celui du nucléotide, et l'extrémité 3' OH de la chaîne en croissance peut continuer à recevoir de nouveaux nucléotides.

- Fourche de réplication

Pour que l'ADN puisse se répliquer, il faut que les deux brins soient séparés. La double hélice est ouverte par l'hélicase et des protéines de liaison à l'ADN simple brin (SSB) maintiennent l'hélice déroulée simple brin.

La fourche de réplication est initiée par des protéines d'initiation (gyrases) qui se fixent sur une séquence particulière : l'origine de réplication pour dérouler l'ADN. L' hélicase se lie ensuite à ce complexe et ouvre la molécule d'ADN.

Pour que la synthèse de la nouvelle chaîne puisse commencer, il faut une amorce, puisque l'ADN polymérase III ne peut pas commencer "dans le vide". Une enzyme appelée Primase synthétise, sans avoir besoin d'extrémité 3'OH, une petite molécule d'ARN (environ 10 nucléotides) apparié à la matrice qui sert d'amorce pour l'ADN polymérase.

La réplication se faisant toujours dans le sens 5'-3', la situation est différente sur les deux brins : sur l'un, la fourche avance de 3' vers 5' et la chaîne complémentaire peut être synthétisée directement en suivant la progression de la fourche : c'est la synthèse du brin précoce ou continu. Sur l'autre brin, par contre, il faut attendre que la fourche se soit ouverte pour mettre la synthèse en direction opposée à la progression de l'hélicase. La chaîne tardive est donc synthétisée sous forme de fragments appelés fragments d'Okazaki, qui font de 100 nucléotides de long chez les eucaryotes à 1000 nucléotides de long chez les procaryotes. Une amorce d'ARN est nécessaire pour le début de chaque fragment. Ces amorces sont ensuite excisées et remplacées par de l'ADN, grâce à l'ADN polymérase I.

2-Réplication chez les eucaryotes

Les ADN polymérases

Il en existe 5 : alpha, bêta, gamma, delta, epsilon.

Alpha, delta et epsilon participent à la réplication du chromosome. Bêta intervient dans la réparation de l'ADN et Gamma dans la réplication de l'ADN mitochondrial.

ADN polymérase	nombre de sous unités	activités
alpha	4	1 polymérase 2 Primase 1 pour le maintient de la structure alpha n'a pas d'activité exonucléasique 3'->5'
delta	2	1 activité exonucléasique 3'->5' Pas d'activité Primase
epsilon	2	1 activité exonucléasique 3'->5' Pas d'activité Primase
beta	1	Impliquée dans la réparation de courts fragments d'ADN
gamma	2	1 activité exonucléasique 3'->5' Responsable de la réplication de l'ADN mitochondriale dont la réplication est indépendante de l'ADN nucléaire

Activités des différentes ADN polymérases chez les eucaryotes

INITIATION

Compte tenu de la taille des brins d'ADN chromosomique la réplication a plusieurs origines de réplication. Chaque origine de réplication est appelée œil de réplication et constitue un réplicon ou unité de réplication.

Pour un œil de réplication on a 2 complexes multienzymatiques qui vont en sens inverse. Chez les eucaryotes les fragments d'Okazaki sont plus petits (environ 100pb). Ces fragments ont à leur extrémités des fragments d'ARN (10 nucléotides) synthétisés par une Primase :

- alpha est uniquement responsable de la synthèse des amorces et quelques désoxynucléotides(30). Le brin continu est répliqué par epsilon; delta/PCNA réplique le brin discontinu.

Dans tous les cas on a sur un brin une ADN polymérase très processive et sur l'autre brin la processivité est moindre. Lors de la réplication l'ADN simple brin est stabilisé grâce à des protéines : RP-A ou RF-A, équivalent aux SSB chez E.Coli (Single Stranded DNA Binding Protein). Les amorces ARN sont supprimées par la RNAse H, les trous ainsi formés sont bouchés par bêta. Les fragments sont reliés une ADN ligase. Il existe 3 ADN ligase (I, II, III) dont la I est indispensable à la réplication du chromosome. Quand aux topos isomérases, il y en a 2 (I et II).

Outils du génie génétique (Résumé)

I-les Enzymes :

I-1 Enzymes de restriction

I.1.1 Les exonucléases : Elles digèrent l'ADN à partir de l'extrémité 5' ou 3'.

I.1.2 Les endonucléases : Elles coupent l'ADN à l'intérieur en cassant les liaisons phosphodiester.

Il y a deux catégories d'endonucléases : celles qui donnent des extrémités franches et celles qui donnent des extrémités cohésives.

I-2 ADN polymérases

I-2-1 Fragment de Klenow : Actif à 37°C, Permet de remplir les hiatus pour marquer des molécules d'ADN (Nick translation).

I.2.2 Taq polymérase : Active à 70°C, utilisée dans la technique PCR, en vu d'amplifier l'ADN in vitro.

I-3 Les ligases

Elles réalisent des liaisons phosphodiester, pour souder deux segments d'ADN.

II-Les vecteurs

II-1 Vecteur de clonage : Renferme une Ori V, il permet de cloner un segment d'ADN ou un gène qui y est intégré.

II-2 Vecteur d'expression : Renferme un promoteur, il permet de faire exprimer un gène.

III- Les sondes moléculaires

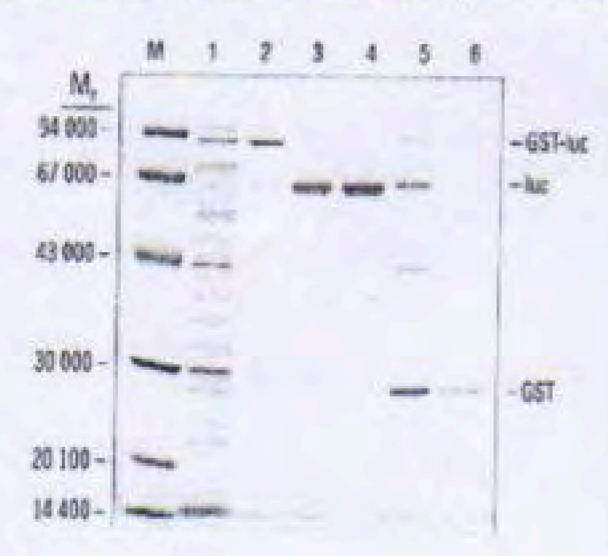
Séquence d'ADN monocaténaire, marquée, complémentaire du gène recherché, son rôle est la détection de gènes notamment en diagnostic génétique.

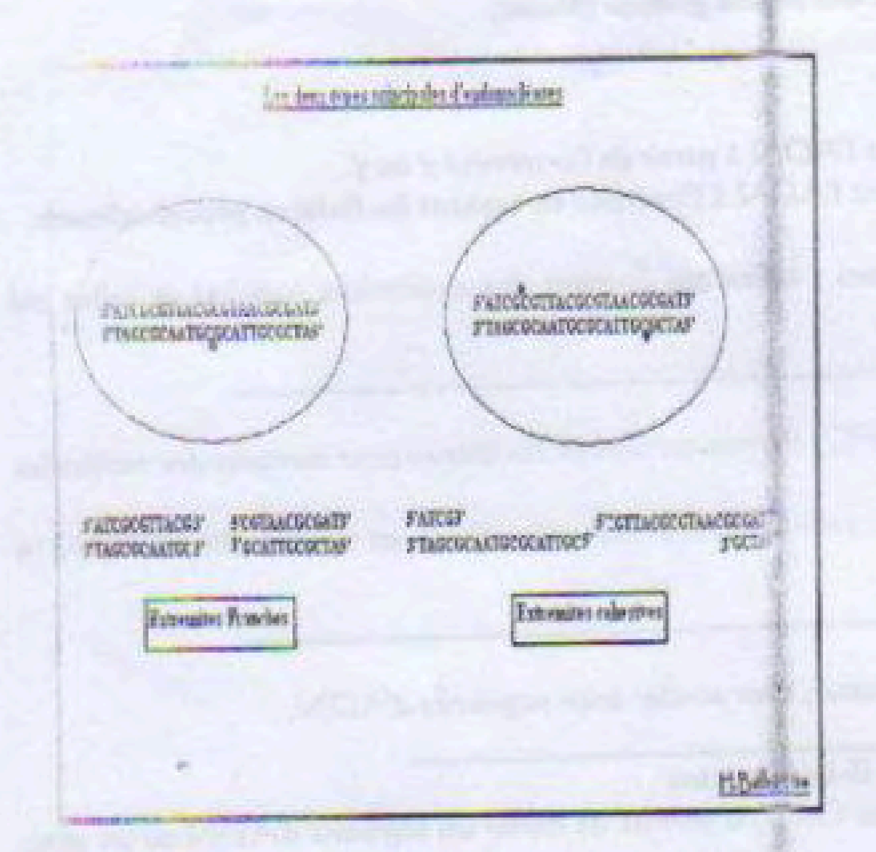
IV- Les techniques

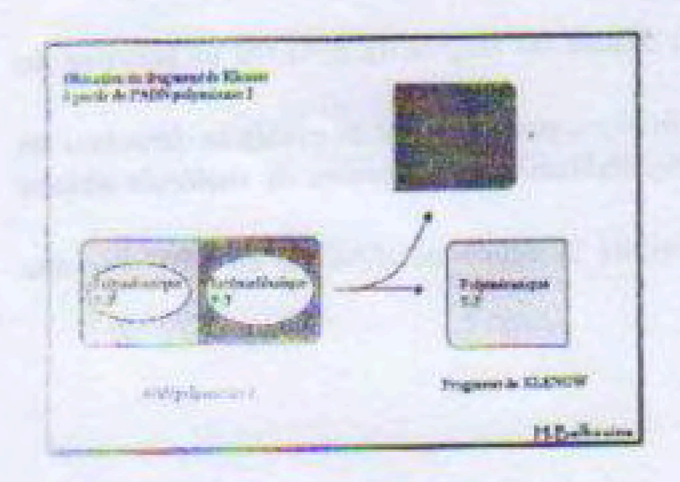
IV-1 Technique d'électrophorèse sur gel d'agarose : Sépare les fragments d'ADN en fonction du poids moléculaire.

IV-2 Technique PCR : Permet d'amplifier l'ADN in vitro, par une série de cycles se déroulant en trois étapes : dénaturation, hybridation de l'amorce, réplication. Le nombre de molécule obtenu après n cycles et 2^n

IV-3 Technique de séquençage : permet de déterminer la séquence d'ADN en réalisant une réplication en présence de didésoxynucléotides.




Extrémités Franches
Extrémités cohésives


Fragment de KLENOW